

Redaktion

F. Moosig, Lübeck/Bad Bramstedt
 O. Distler, Zürich

A. Jüngel · S. Gay
 Rheumaklinik, UniversitätsSpital Zürich

Epigenetik in der Rheumatologie

Epigenetische Regulation der Genexpression

Struktur der DNA

Zum besseren Verständnis werfen wir zunächst einen Blick auf die Struktur der DNA im Kern der Zelle (■ **Abb. 1**). Chemisch betrachtet ist die DNA ein Polymer aus vielen Bausteinen, den so genannten Nukleotiden. Jedes Nukleotid hat 3 Komponenten und besteht aus einem Phosphatrest, dem Zucker Desoxyribose sowie einer heterozyklischen Nukleotidbase. Die Desoxyribose und der Phosphatrest bilden das Rückgrat der DNA, wobei zwei dieser linearen Stränge die Doppelhelixstruktur formen, ähnlich der Struktur einer Strickleiter. Beide Stränge sind über vier Nukleotidbasen: Adenin (A) und Guanin (G; so genannte Purinbasen) sowie Thymin (T) und Cytosin (C; so genannte Pyrimidinbasen) verbunden. Die Stränge sind komplementär, d. h. die Reihenfolge der Basen des einen Strangs bestimmt die Reihenfolge der Basen des anderen Strangs, da sich nur die Basenpaare A und T sowie G und C verbinden können.

Die DNA des Menschen besteht aus etwa 3 Mrd. Nukleotiden. In bestimmten Abschnitten der DNA (3–5%), den Genen, wird genetische Information kodiert. Die Gene enthalten die „Baupläne“ (Aminosäuresequenzen) für alle Eiweißmoleküle (Proteine), die in einer Zelle produziert werden. Um alle 20 Aminosäuren, die ein Mensch hat, zu verschlüsseln, wird eine Abfolge von jeweils drei Nukleotidbasen eines Einzelstranges genutzt. Dabei können mehrere Basentriplets ein und dieselbe Aminosäure verschlüsseln (Triplet-Code). Die restliche

DNA (etwa 95%) besteht zum Teil aus unbekannten Sequenzen und aus nicht-(Protein-)kodierenden RNAs (ncRNAs). Die Bedeutung der ncRNAs wird immer deutlicher, da sie genregulatorische (Promotoren, Enhancer, microRNAs) Funktionen haben [1].

Ergebnisse des Humanen Genomprojekts

Jede menschliche Zelle enthält im Kern fast 2 m DNA, die stark aufgewunden in Chromosomen verpackt ist. Die Gene sind dabei ungleichmäßig verteilt: Chromosom 19 enthält die meisten und Chromosom 18 die wenigsten Gene. Die Entzifferung des menschlichen Genoms war das große Ziel des internationalen Humanen Genomprojekts (HGP, „Human Genome Project“), das nach 13 Jahren – im Jahr 2003 – erfolgreich abgeschlossen wurde [2]. Die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms sollte die Voraussetzungen bilden, Erbkrankheiten zu erforschen, den Ursprung bestimmter Krankheiten besser zu verstehen und insbesondere molekulare Mechanismen der Krebsentstehung aufzudecken, um neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

Die ernüchternde Erkenntnis des HGP war jedoch, dass das Genom viel komplexer arbeitet als zunächst erwartet, da das menschliche Genom tatsächlich aus nur etwa 25.000 bis 30.000 Genen besteht, aber etwa 500.000 bis 1 Mio. verschiedene Proteine hervorbringt. Der Mensch besitzt nur 300 Gene, die die Maus nicht hat, und nur 2% der Gene unterscheiden uns vom Schimpansen – mit der Einschränkung, dass die Anzahl der Kopien bestimmter Gene im Erbgut

von Mensch und Schimpanse stark variieren.

Demzufolge konnte die Hypothese der Molekularbiologie und Molekulargenetik, nach der ein Gen für ein Protein kodiert, nicht mehr gehalten werden. Die biologische Information kann also nicht allein in der Abfolge der Gene stecken. Weitere Mechanismen während und nach der Umschreibung der DNA (Transkription) in Boten-RNA (messengerRNA) und bei der Umschreibung von messengerRNA in Proteine (Translation) müssen demnach zusätzlich die Proteinexpression regulieren.

Was genau sind epigenetische Modifikationen?

Wir wissen heute, dass auch so genannte epigenetische Modifikationen (■ **Abb. 1**) Zelleigenschaften bzw. den Phänotyp beeinflussen können. Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind epigenetische Modifikationen per Definition alle mitotisch und meiotisch vererbaren Modifikationen, die aber keinen Einfluss auf die Sequenz der Gene haben [3]. Unterschiedlich ist auch, dass epigenetische Modifikationen generell reversibel sind. Vereinfacht bedeutet das, epigenetische Modifikationen können die Expression von Genen und Proteinen regulieren und diese Information kann an die nächste Generation weitervererbt oder aber auch wieder rückgängig gemacht werden.

Epigenetische Modifikationen umfassen definierte chemische Kennzeichnungen am Chromatin, also an der DNA sowie den nukleären Proteinen (Histone) und beeinflussen die Struktur der DNA im Kern der Zelle, die sehr variabel ist. Das Chromatin existiert in kondensier-

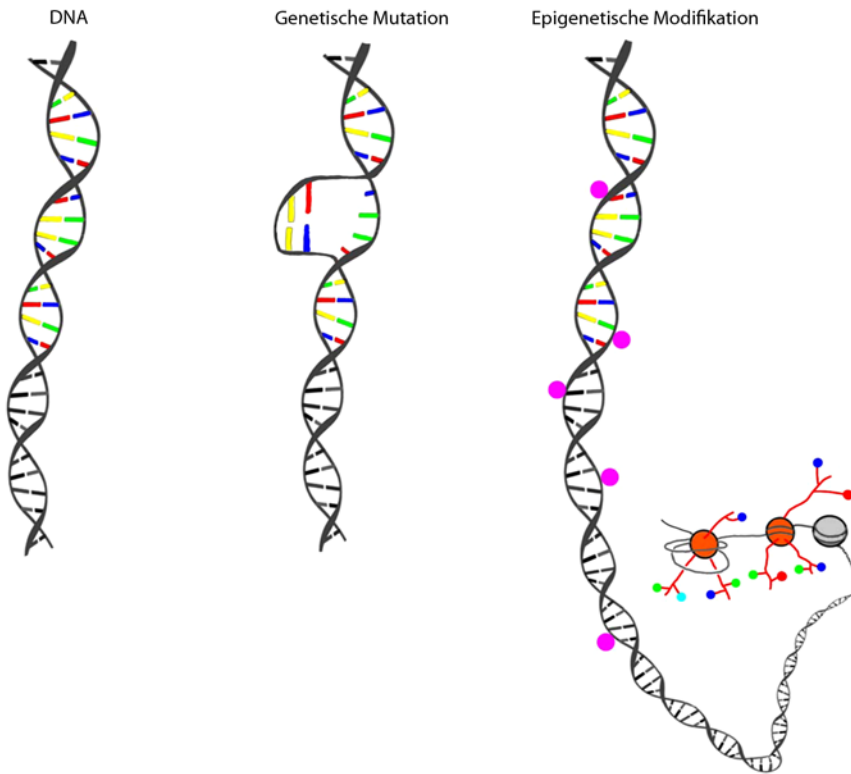


Abb. 1 ▲ Im Gegensatz zu genetischen Mutationen ändern epigenetische Modifikationen nicht die Buchstabenfolge in der DNA. Epigenetische Modifikationen sind kleine chemische Anhängsel an der DNA oder den nukleären Proteinen, den Histonen. Modifikationen direkt an der DNA (pink), Methylierung, kennzeichnen die DNA als nicht ablesbar, vergleichbar mit einem Stoppsignal. Modifikationen an den Histonen nehmen Einfluss auf den Verdichtungsgrad der DNA im Kern der Zelle und somit auf die Verfügbarkeit der Information für den Transkriptionsapparat oder andere DNA-bindende Moleküle

ter und nichtkomprimierter Form. Damit die 2 m lange DNA im Zellkern zur Chromosomenstruktur komprimiert und somit bis um das 50.000-Fache verkürzt werden kann, ist sie um Histone gewunden. Histone bestehen aus einem globulären Zentrum und flexiblen endständigen Armen („histone tails“), die viele basische, also positiv geladene Aminosäuren besitzen. Die kleinste Verpackungseinheit der komprimierten DNA ist ein Nukleosom, zusammengesetzt aus 8 Histonen, aus je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Die um die Histone gewickelte DNA (etwa 146 Basenpaare) und die DNA zwischen 2 Nukleosomen („Linker-DNA“, etwa 200 Basenpaare) haben definierte Längen. Das verbleibende Histon H1 verknüpft die einzelnen Nukleosome und induziert eine weitere Komprimierung der DNA. Da die DNA negativ geladen ist, entsteht eine starke elektrostatische Anziehung zu den positiv geladenen Histonen.

Modifikationen der DNA und der Histone induzieren also eine Reorganisation des Chromatins, das entweder dichter verpackt oder stellenweise gelockert wird. Kommt es zu einer lokalen Lockerung der sonst stark aufgewundenen DNA, wird diese für Transkriptionsfaktoren oder andere DNA-bindende Moleküle zugänglich und ermöglicht das Ablesen der genetischen Information (Euchromatin). Hingegen, wenn die Packungsdichte des Chromatins zunimmt, vermindert sich die Wahrscheinlichkeit, dass die DNA an dieser Stelle abgelesen werden kann. Diese verschlossenen Bereiche werden auch Heterochromatin genannt.

Einfluss epigenetischer Modifikation

Wie epigenetische Modifikationen Einfluss auf die menschliche Entwicklung nehmen können, kann man am Beispiel von eineiigen Zwillingen beobachten. Bei der Entstehung monozygoter Zwillinge

klont sich eine unbefruchtete Eizelle und bringt zwei separate Embryos hervor. Beide Embryos beginnen ihr Leben mit der gleichen genetischen Ausstattung. Aber während sie aufwachsen und sich entwickeln, machen sie unterschiedliche Erfahrungen mit ihrer Umgebung (DNA-Methylierungsmuster), von denen einige ihr Aussehen und ihr Verhalten verändern können. Es kommt sogar vor, dass ein Zwilling an einer Erbkrankheit leidet, während der andere davon verschont bleibt.

Auch bei der Entstehung von Tumoren spielen epigenetische Modifikationen eine wesentliche Rolle, wobei bestimmte Bereiche der DNA durch Methylierungen fälschlicherweise als nicht ablesbar gekennzeichnet werden. Betrifft die Abschaltung so genannte krebsunterdrückende Gene (Tumorsuppressorgene), die normalerweise Zellzyklus und Zelltod (Apoptose) regulieren, kommt es zur Erkrankung. Eine Umkehrung der durch diese Modifikation (Hypermethylierung) hervorgerufenen Inaktivierung dieser Tumorsuppressorgene wird heute bereits bei der Behandlung bestimmter Krebserkrankungen durch neue, die Epigenetik modulierende Medikamente erreicht.

Dass epigenetische Modifikationen auch durch Ernährung induziert werden können, wurde eindrücklich am Beispiel der Agouti-Mäuse gezeigt [4]. Eines der zahlreichen Gene, das die Fellfarbe bei Mäusen reguliert, ist das Agouti-Gen. Wenn das Agouti-Gen keine oder nur wenige epigenetische Modifikationen (Methylierungen) aufweist, ist es aktiv, und die Tiere haben eine gelbe Fellfarbe. Die Agouti-Mäuse haben einen speziellen Phänotyp und entwickeln spontan Erkrankungen, wie Fettleibigkeit, Diabetes und Krebs. Fütterte man die Mäuse allerdings vor der Paarung und während der Schwangerschaft mit einer besonders methylierreichen Ernährung (Vitamin B12, Folsäure und Cholin), hatten diese Nachkommen, die eine braune Fellfarbe aufwiesen und weit weniger krankheitsanfällig waren. Es konnte dokumentiert werden, dass diese spezielle Ernährung epigenetische Modifikationen (vermehrten Methylierung) des Agouti-Gens

induzierte und deshalb zu dessen Stummschaltung führte.

Ein weiteres Beispiel soll verdeutlichen, dass epigenetische Modifikationen durch die Ernährung induziert werden können. Bei den Honigbienen erhält die zur Königin auserwählte Larve aus den sonst genetisch identischen Larven eine spezielle Ernährung und entwickelt sich deshalb zur Königin, d. h. sie wird als einzige geschlechtsreif und lebt länger als die Arbeiterinnen. Experimentell konnte gezeigt werden, dass diese Ernährung zu diesem speziellen Zeitpunkt die Aktivität eines Enzyms, der DNA-Methyltransferase 3 (DNMT3), hemmt, welches epigenetische Modifikationen vermittelt. Besonders interessant ist, dass ein experimentelles Hemmen der DNMT3 in diesem Entwicklungsstadium durch siRNA („small interfering RNA“) sämtliche Larven zu Königinnen heranreifen lässt.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist also das Epigenom eine dem Genom übergeordnete Instanz mit programmierbarer An- und Abschaltautomatik, die darüber entscheidet, ob die Informationen bestimmter DNA-Regionen genutzt oder unterdrückt werden. Erst beide Instanzen zusammen, das Genom und das Epigenom, bilden den Gesamtdatensatz des Menschen und beeinflussen den Phänotyp. Da epigenetische Modifikationen leichter zu beeinflussen sind als Änderungen in der Sequenz der DNA und darüber hinaus auch reversibel sind, eröffnet sich ein neuer Weg, therapeutisch in die Proteinexpression einzugreifen. Um die Epigenomforschung voranzutreiben, wurden deshalb weltweit Förderprogramme aufgelegt, wie das 190-Mio.-US\$-„Roadmap Epigenomics Program“ der US-Gesundheitsbehörde NIH („National Institutes of Health“, 2008–2014) oder das 30-Mio.-Programm für ein Epigenetikonsortium der Europäischen Kommission. Ganz nach dem Vorbild des HGP formierte sich dieses Jahr auch ein Zusammenschluss internationaler Forscher zur Bildung des „International Human Epigenome Consortium“ (IHEC).

Epigenetische Modifikationen

DNA-Methylierung

Die meist untersuchte und am besten beschriebene epigenetische Modifikation ist die DNA Methylierung – die einzige epigenetische Veränderung direkt an der DNA. Diese Modifikation beinhaltet zwei Komponenten: zum einen das Enzym, die DNA-Methyltransferase (DNMT), welche die Methylierung vermittelt, und zum anderen die Methyl-CpG-bindenden Proteine („methyl-CpG binding proteins“, MECP2), die die transkriptionelle Repression verstärken. Bei der Methylierung bindet die DNMT posttranskriptionell an der Position 5 des Cytosinrings kovalent eine Methylgruppe (CH₃-Gruppe), wobei Methylcytosin entsteht. Cytosin in der DNA kann also unverändert oder in einer methylierten Version vorliegen; allerdings wird Cytosin nur dann methyliert, wenn direkt darauf die Base Guanin folgt.

Die DNA-Methylierung spielt in zahlreichen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle

Regionen im Genom mit erhöhter Cytosin-Guanin-Dichte werden CpG-Inseln („Cytosin-phosphatidyl-Guanin islands“, „CpG-islands“) genannt. Das einmal generierte Methylierungsmuster einer Zelle wird bei jeder weiteren Teilung beibehalten. De-novo-Methyltransferasen (DNMT3a und 3b) erkennen spezifische Stellen in der DNA, welche es ihnen erlauben, Cytosin *de novo* zu methylieren. Dies ist besonders wichtig in der frühen Embryonalentwicklung, da durch sie ein neues Methylierungsmuster aufgebaut wird. Dagegen fügen Erhaltungsmethyltransferasen („Maintenance-Methyltransferasen“, DNMT1) Methylgruppen an solchen Stellen der DNA an, an denen an einem DNA-Strang schon eine Methylgruppe vorhanden ist, also während der Replikation. Dadurch wird das Methylierungsmuster, welches einmal in der Embryonalentwicklung aufgebaut wurde, erhalten.

Die DNA-Methylierung spielt in zahlreichen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle, so z. B. bei der Inaktivie-

Zusammenfassung · Abstract

Z Rheumatol 2011 · 70:205–212
DOI 10.1007/s00393-010-0689-y
© Springer-Verlag 2011

A. Jüngel · S. Gay

Epigenetik in der Rheumatologie

Zusammenfassung

Die Erbsubstanz aller Lebewesen besteht aus DNA („desoxyribonucleic acid“). Jede Zelle unseres Körpers enthält die gleiche genetische Ausstattung. In embryonalen Stammzellen ist eine gleichbleibende Anzahl Gene aktiv, und die Zellen sind identisch in ihrem Aufbau und ihrer Funktion. Sobald sich aber unterschiedlich spezialisierte Zellen entwickeln (Differenzierung), unterscheiden sie sich deutlich voneinander, wie z. B. Leber von den Nervenzellen. Diese Unterschiede gehen nicht auf Änderungen in der Sequenz der DNA zurück, sondern darauf, dass in verschiedenen Zellen unterschiedliche Gene aktiv sind. Das bedeutet, dass ganz gezielt Informationen in der einen Zelle unterdrückt werden müssen, die in anderen wiederum aktiv sind und so verhindert wird, dass z. B. Muskelzellen Haare hervorbringen oder Gehirnzellen Leberenzyme produzieren. Wie kommt es, dass Gene in differenzierten Zellen ein gewebeartypisches Set an Genen aktivieren, während sie in anderen Zellen abgeschaltet sind?

Schlüsselwörter

Epigenetik · DNA-Methylierung · Histon-(De-)Acetylierung · Histon-Methylierung · MiRNA

Epigenetics in rheumatic diseases

Abstract

The human genome comprises approximately 30000 genes needed for the formation and function of approximately 1 Million proteins in the human body. Differentiation leads to the deactivation of genes that are not needed in the specific tissues or cells. To regulate the cell specific gene expression in normal cells epigenetic modifications work in concert with genetic mechanisms. In contrast to genetic mutations, epigenetics encompasses the wide range of heritable changes in gene expression that do not result from alteration in the DNA sequence itself. A dysregulation of epigenetic modifications results in diseases such as cancer or autoimmune diseases. Since these epigenetic modifications of the DNA and the histones are reversible they are good targets for novel therapeutic intervention.

Keywords

Epigenetics · DNA methylation · Histone (de-)acetylation · Histone methylation · MiRNA

nung eines der beiden X-Chromosomen (bei Frauen), dem genomischen Imprinting (eine in der frühen Embryonalentwicklung stattfindende Prägung einzelner Gene), der Stabilisierung der Chromatinstruktur, dem Alterungsprozess und der Differenzierung von embryonalen Stammzellen (fetale Entwicklung). „Knock-out-Tiere“, bei denen das Gen für DNMT1 ausgeschaltet wurde, weisen bis zu 90% weniger Methylierungen der DNA auf und sterben früh in ihrer Embryonalentwicklung.

Epigenetische Modifikationen bei Autoimmunerkrankungen

Dass epigenetische Modifikationen eine Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen, wurde zuerst bei der Erkrankung systemischer Lupus erythematodes (SLE) nachgewiesen [5]. Aufgrund der Beobachtungen, dass bestimmte Medikamente die Erkrankung in genetisch prädisponierten Menschen induzieren können und eine inkomplette Konkordanz bei genetisch identischen Zwillingen besteht, ließ vermuten, dass Umwelteinflüsse die Erkrankung induzieren können. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Erkrankung eine fortschreitende Demethylierung von Immunzellen zur veränderten Genexpression und infolgedessen zur Autoreaktivität von Lymphozyten führt.

Epigenetische Modifikationen bei rheumatoider Arthritis

In der Tumorbologie ist bekannt, dass epigenetische Modifikationen wie Hypermethylierung von Tumorsuppressorgen und Hypomethylierung von Protoonkogenen zur Krebsentstehung führen. Vergleichen wir die aggressiven und invasiv wachsenden synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), die darüber hinaus noch eine Apoptoseresistenz aufweisen, mit Krebszellen, wird deutlich, warum diese Zellen als „tumorähnlich“ bezeichnet werden [6].

Es gibt immer mehr Hinweise, dass epigenetische Modifikationen auch bei der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle spielen.

Dies zeigen die folgenden Beispiele: Methylierung im Promotor eines Gens, das den Zelltod reguliert, „death-receptor 3“ (DR3) in RA-synovialen-Fibroblasten (RASf) führte zur gesteigerten Apoptoseresistenz dieser Zellen [7]. Weiterhin haben LPS- (Lipopolysaccharid-) stimulierte Makrophagen von Patienten mit RA, die besonders hohe Interleukin- (IL-)6-Werte aufweisen, signifikant reduzierte Methylierungsmarkierungen im IL-6-Promotor [8]. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass die DNA im synovialen Gewebe und in isolierten Zellen, den RASf, im Vergleich zu Osteoarthritis (OA) weniger stark methyliert ist. Eine verstärkte Demethylierung der DNA kann aus verminderter Enzymaktivität oder verstärktem Abbau resultieren. Unsere Gruppe konnte belegen, dass RASf defizient sind für das Enzym DNMT1 im Vergleich zu OASF [9].

Wir wissen von der Tumorbologie, dass epigenetische Modifikationen eng zusammen arbeiten mit anderen regulatorischen Mechanismen, wie miRNAs, und dass diese sich auch gegenseitig beeinflussen können [10]. Interessanterweise konnte Johanna Stanczyk von unserer Gruppe zeigen, dass die Therapie von RASf mit 5-AZA die Expression einer regulatorischen RNA, microRNA-203 (miRNA-203), induziert. Die experimentell induzierte Expression dieser miRNA führte zur verstärkten Produktion matrixdegenerierender Enzyme (MMP-1) und dem NF- κ B- („nuclear factor kappa B“) abhängigen Anstieg des inflammatorischer Zyklokin IL-6 [11]. Beide Produkte sind charakteristisch für den aggressiven und invasiven Phänotyp der RASf.

Das Zusammenspiel von epigenetischen Modifikationen und regulatorischen, nicht-Protein-kodierenden RNAs, wie z. B. den miRNAs, bietet vielfältige Möglichkeiten für neue therapeutische Interventionen, die uns bisher nicht zur Verfügung standen [12]. Auf Epigenetik basierende Therapien ermöglichen uns nun auch, neben den entzündungsvermittel-

ten Immunzellen auch die invasiven synovialen Fibroblasten zu behandeln, die bei den bisherigen Therapien weniger im Fokus standen.

Epigenetische Veränderungen der Histone

Epigenetische Veränderungen der Histone werden durch Acetylierung/Deacetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung und Sumoylierung vermittelt.

Histonacetyltransferase (HAT)

Bei der Acetylierung von Histonproteinen ersetzt eine Histonacetyltransferase (HAT) die positive Ladung der Kernproteine (Lysinreste) durch eine von Acetyl-Coenzym A stammende ungeladene Acetylgruppe. Daraus folgt eine Destabilisierung der Chromatinstruktur, da die negativ geladene DNA (Phosphatrest) nicht mehr von den Histonen elektrostatisch gebunden werden kann. Es kommt zu einer lokalen Lockerung der sonst stark aufgewundenen DNA, die ermöglicht, dass Transkriptionsfaktoren oder andere DNA-bindende Moleküle an die DNA binden können. HAT-Enzyme arbeiten in Multienzymkomplexen. Die bekanntesten Familien sind die

- „Gcn5-related N-acetyltransferases“ (GNATs: Gcn5, PCAF),
- „p300/CREB-binding protein“- (CBP)-HATs und
- die „MYST-related“-HATs (MOZ, YBF2/SAS3, TIP60).

Darüber hinaus haben einige Transkriptionsfaktoren intrinsische HAT-Funktionen, wie z. B. SRC-1, ACTR und TIF2.

Übermäßige oder verminderte Acetylierung führt nachweislich zur Tumorbildung.

Aber auch andere Erkrankungen wie Asthma werden auf gestörte Acetylierungsprozesse, wie Hyperacetylierung von Histonen zurückgeführt [13].

Histondeacetyltransferase (HDAC)

Gegenspieler dieser Enzyme sind die Histondeacetyltransferasen (HDACs), die die Acetylgruppen wiederum durch einen

Hier steht eine Anzeige.



positiv geladenen Lysinrest austauschen. Diese enzymatische Reaktion ermöglicht wieder die feste elektrostatische Bindung der Histone an die DNA. Das so induzierte Verschließen der DNA führt zu einer Repression der Genexpression. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit Proteinen aus der Hefe kann man die verschiedenen Isoformen der HDACs in Gruppen einteilen. Zum einen gibt es zinkabhängige HDACs der Klassen 1, 2 und 4.

- Die Klasse 1 HDACs besteht aus den Isoformen 1, 2, 3, und 8. Diese sind im Zellkern lokalisiert.
- Die Klasse 2 HDACs besteht aus den Isoformen 4, 5, 6, 7, 9 und 10.
- HDAC 11 bildet eine eigene Klasse, die Klasse 4.

Beide, Klasse-2- und -4-HDACs liegen vor allem im Zytoplasma vor, können aber auch in den Nukleus transferiert werden. Bereits geringe Änderungen der Proteinkonzentration bzw. der Aktivität für HDACs können immunologische Reaktionen dirigieren. Zum Beispiel hemmt HDAC 11 im Zellkern von Makrophagen die Transkription von IL-10 und provoziert somit entweder eine Aktivierung oder Toleranz in CD4-positiven T-Zellen [14].

HATs und HDACs bei Tumorerkrankungen

Genexpressionsanalysen ergaben, dass die Aktivität von HATs und HDACs in vielen Tumoren verändert ist. Durch das Ungleichgewicht dieser Enzyme werden die Regulierungsmechanismen von Proliferation und Zelltod außer Kraft gesetzt. Die Folge ist ein vermehrtes Wachstum maligne veränderter Zellen. Durch Inhibition der HDAC kann das ursprüngliche Gleichgewicht wieder hergestellt werden. Klasse 1, 2 und 4 der HDACs können durch chemische Inhibitoren (HDACi), wie Trichostatin A (TSA), das zu den Hydroxaminsäuren gehört, in ihrer Aktivität gehemmt werden. HDAC-Inhibitoren passen genau in das katalytische Zentrum der HDACs, das von einer lipophilen Enzymtasche mit einem zentralen Zinkatom umgeben ist. Der HDAC-Inhibitor bildet dann mit dem Zinkatom, das für die enzymatische Reaktion essenziell ist, einen Chelatkomplex. TSA

ist ein natürlich vorkommender Inhibitor für Klasse 1, 2 und 4 HDACs und wird experimentell als Referenzsubstanz verwendet, da es zu den potentesten der bisher entdeckten HDAC-Inhibitoren zählt. TSA wurde als Fungizid aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert, wird aber wegen des Verdachts mutagen zu sein und wegen fehlender Spezifität nicht klinisch eingesetzt.

Die Entwicklung weiterer und vor allem isotypspezifischer Inhibitoren zu therapeutischen Zwecken bei Krebserkrankungen stehen im Fokus der pharmazeutischen Industrie [15, 16]. Sie greifen, anders als Zytostatika, selektiv in die Regulierung von Tumorzellen (Proliferation, Zelltod) ein, wohingegen normale Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Dies erklärt die niedrige Toxizität im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika. SAHA (Vorinostat) ist ein künstlich hergestellter Pan-HDAC-Inhibitor und ein zugelassenes Medikament für die Krebstherapie [17]. Es wird zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms eingesetzt. Eine andere Substanz, die im Nachhinein als HDAC-Inhibitor identifiziert wurde, ist das seit Jahren verwendete Antiepileptikum Valproat.

HATs und HDACs wurden nach ihrem Hauptsubstrat benannt. Sie haben aber neben den Histonen noch ein breites Substratspektrum. Beide modifizieren auch Nicht-Histon-Proteine und wirken dadurch ebenfalls regulierend auf die Genexpression. HATs und HDACs können z. B. die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie p53, nukleäre Transportproteine oder Strukturproteine der Zelle, wie Tubulin, mit ihrer enzymatischen Funktion verändern und so entscheidend in den Metabolismus der Zelle eingreifen.

Zusammengefasst sind HATs und HDACs die enzymatischen Komponenten hochmolekularer Multiproteinkomplexe mit Aktivator- oder Repressoraktivität. Allerdings können HATs und HDACs ihrerseits posttranskriptionell modifiziert werden, was dann ihre Aktivität gegenüber Histonen und Nicht-Histon-Proteinen, die zelluläre Lokalisation und die Interaktion mit anderen DNA-bindenden Molekülen beeinflussen kann.

HATs und HDACs bei rheumatischen Erkrankungen

Inwieweit HATs und HDACs zur Pathogenese rheumatischer Erkrankungen beitragen, soll anhand der folgenden Beispiele verdeutlicht werden. In unterschiedlichen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit HDAC-Inhibitoren (TSA und SAHA) die Induktion der Arthritis entweder verhindern konnte bzw. die Symptome stark abgemildert wurden [18]. Deshalb wurden HDAC-Inhibitoren zur Behandlung von inflammatorischen Autoimmunerkrankungen vorgeschlagen, obwohl die genaue Wirkungsweise nicht bekannt ist.

Die Gesamt-HDAC-Aktivität im synovialen Gewebe von RA-Patienten ist vermindert

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Gesamt-HDAC-Aktivität im synovialen Gewebe von Patienten mit RA geringer ist als die von OA-Patienten oder von Gesunden. Weiterhin konnten wir auch eine Reduktion der Isoformen HDAC1 und HDAC2 in diesen Geweben aufzeigen [19]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Behandlung der RA-Patienten mit HDAC-Inhibitoren eher nicht indiziert. Da wir eine Verminderung der HDAC-Aktivität um 75% beobachteten, ist es aber nicht auszuschließen, dass eine Restaktivität auf HDAC-Inhibitoren ansprechen könnte. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Wirkung der HDAC-Inhibitoren im Tiermodell durch Nicht-Histon-Proteine vermittelt sein könnte. Acetylierung und Deacetylierung sind hoch dynamische Prozesse – inwieweit diese auch durch Medikamente und Ernährung zu beeinflussen sind, ist bisher noch nicht vollständig untersucht [20].

Auch in anderen rheumatischen Erkrankungen trägt ein Ungleichgewicht an HATs und HDACs zur Pathogenese bei. In Chondrozyten von Patienten mit Osteoarthritis konnte eine übermäßige Produktion an HDAC1 und HDAC2 nachgewiesen werden [21], die eine verminderte Produktion an knorpelspezifischen Proteinen (Aggrecan, Kollagen Typ 2) zur Folge hatte. Auch eine übermäßige Produktion von HDAC7 wurde in Knorpelzellen von OA-Patienten be-

schrieben. Ein experimentelles Vermindern von HDAC7 in diesen Zellen mit siRNA unterdrückte die IL-1-induzierte Expression von Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13; [22]). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das experimentelle Ausschalten von HDAC7 in Hautfibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerose (SSc) die Produktion an extrazellulären Matrixproteinen deutlich vermindert. Diese Befunde konnten im Tiermodell der Bleomycin-induzierten Hautfibrose bestätigt werden, wobei eine deutliche Reduktion der extrazellulären Matrix in der Haut zu beobachten war [23].

Klasse-3-HDACs

Eine eigene Gruppe bilden die HDACs der Klasse 3. Dabei handelt es sich um zinkunabhängige NAD-abhängige Enzyme, die so genannten Sirtuine, bestehend aus 7 Isoformen. Diese Gruppe der HDACs ist nicht TSA-sensitiv. Sirtuine haben in den letzten Jahren eine besonders hohe Aufmerksamkeit erhalten, da sie an der Regulierung von Alterungsvorgängen, Zelltod (Apoptose) und Stressresistenz beteiligt sind und so eine Rolle bei Erkrankungen, wie Alzheimer, M. Parkinson, Diabetes mellitus und Adipositas spielen. Fabienne Niederer aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Isoformen Sirt-1 und Sirt-4 in RASF vs. OASF verstärkt exprimiert sind und eine Rolle bei der Signalübermittlung des unspezifischen Immunsystems spielen [24]. In Chondrozyten reguliert Sirt-1 die Expression von knorpelspezifischen Genen und den Zelltod [25].

Methylierung von Histonen

Die Methylierung von Histonen ist ein sehr dynamischer und flexibler Prozess. Deren Lysin- und Argininreste können einfach, doppelt oder gar dreifach methyliert werden. Im Gegensatz zur DNA-Methylierung induzieren Histonmethylierungen, je nachdem wo sie stattfinden, transkriptionelle Repression (H3K9, H3K27, H4K20) oder transkriptionelle Aktivierung (H3K4, H3K36, H3K79; [26]). EZH2 („enhancer of Zeste homologue 2“) ist die katalytische Komponente der hoch konservierten Histonmethyltransferase „polycomb repressi-

ve complex 2“ (PRC2), die Lysin 27 von Histon 3 methyliert und zur Genrepression beiträgt. EZH2 ist bei verschiedenen Krebserkrankungen überexprimiert [27]. Im Gegenzug dazu entfernt die „Jumonji C-domain protein“- (Jmjd3-) Histondemethylase H3K27-Methylierungen. Dabei induziert sie den Transkriptionsprozess. Diese Demethylase spielt auch eine Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen mit positiven „anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies“ (ANCA). Hierbei ist Jmjd3 überexprimiert und H3K27 vermindert zu finden bei den für diese Erkrankung charakteristischen Genen für Proteinase 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO; [28]).

➤ Jmjd3 reguliert die Genexpression bei entzündlichen Prozessen

Jmjd3 ist für uns von besonderem Interesse, da es nach mikrobieller Stimulation durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert wird und so die Genexpression bei entzündlichen Prozessen reguliert. Michelle Trenkmann von unserer Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Methyltransferase EZH2 in RASF vs. OASF konstitutiv aufreguliert ist und durch inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF- α) induziert werden kann [29].

Die Rolle der microRNAs

Da die Regulation der methylierten und (de-)acetylierten Enzyme durch eine neue Klasse von Regulatoren, den microRNAs (miRNAs) moduliert wird, gilt es in dieser kurzen Übersichtsarbeit darüber hinaus, die wichtige Rolle der miRNAs näher zu beschreiben. Hier kurz zur Biogenese von miRNAs: miRNAs sind kleine (19–30 Nukleotide) endogene, einsträngige, nicht-Protein-kodierende RNAs (ncRNAs), die posttranskriptionell die Expression von Genen regulieren können. Dieser Mechanismus der Genregulation ist hoch konserviert und kommt in ähnlicher Form im Genom von Tieren, Pflanzen, Pilzen und Viren vor. Es wird vermutet, dass bis zu 1% des humanen Genoms für miRNAs kodiert, bisher sind etwa 800 miRNAs im Menschen beschrieben.

miRNAs spielen eine Rolle bei physiologischen wie auch pathologischen Prozessen, da sie Bereiche wie Zellzyklus, den Zelltod, Hämatopoese, immunologische Reaktionen und Angiogenese bei Krebserkrankungen regulieren. Die Biogenese verläuft in zwei unterschiedlichen Kompartimenten. Im Nukleus wird das Primärtranskript, bis zu 1 kb, durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Dieses Primärtranskript wird noch im Nukleus von der Endonuklease Drosha weiter prozessiert in eine 70 Nukleotide umfassende Vorläufer-miRNA mit Haarnadelstruktur („stem-loop“). Dieses Produkt wird dann ins Zytoplasma transportiert und weiter durch Dicer, einem RNase-II-Enzym, zu einem kurzen doppelsträngigen Duplexmolekül verarbeitet. Das Duplexmolekül wird dann in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingeschleust und entwunden, wobei die fertige miRNA entsteht, die an ihr Zielgen binden kann.

miRNAs führen auf zwei Wegen zur Hemmung der Proteinsynthese: Eine unvollständige Bindung an die Ziel-mRNA führt zu deren Degradation. Dagegen führt eine unvollständige komplementäre Bindung zur Hemmung der Translation. Unsere Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte Expression der miR-155, miR-146 und miR-203 in RASF nachweisen. Die Aufregulierung dieser miRNAs induziert den aggressiven und invasiven Phänotyp dieser Zellen, da sie zur Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 und MMP-Produktion (MMP-1, -3) beitragen.

— Zusammen mit epigenetischen Modifikationen stellen miRNAs eine weitere Option dar, therapeutisch in die Genexpression einzugreifen.

Erste klinische Tests mit gegen miRNA gerichtete RNA-Analoga zur In-vivo-Anwendung laufen mit miR-122 [30]. Diese „antagomirs“ sollen die Replikation von Hepatitisviren in Schimpansen hemmen. Es ist das erste Medikament, für das nun klinische Studien der Phase I laufen.

Fazit für die Praxis

- Epigenetische Modifikationen können Zelleigenschaften bzw. den Phänotyp beeinflussen, können weitervererbt, aber auch wieder rückgängig gemacht werden.
- Das Epigenom entscheidet, ob die Informationen bestimmter DNA-Regionen genutzt oder unterdrückt werden.
- Epigenetische Modifikationen eröffnen neue Wege für therapeutische Interventionen, z. B. gegenüber invasiven synovialen Fibroblasten.
- HATs und HDACs können posttranskriptionell modifiziert werden, wodurch ihre Aktivität gegenüber Histonen und Nicht-Histon-Proteinen, die zelluläre Lokalisation und die Interaktion mit anderen DNA-bindenden Molekülen beeinflusst werden kann.
- miRNAs spielen eine Rolle bei physiologischen wie auch pathologischen Prozessen. Sie stellen eine Option dar, therapeutisch in die Genexpression einzugreifen.

Korrespondenzadresse

PD Dr. A. Jüngel



Rheumaklinik,
UniversitätsSpital Zürich
Gloriastr. 23, 8091 Zürich
Schweiz
Astrid.Juengel@usz.ch

Interessenkonflikt. Die korrespondierende Autorin gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Alexander RP, Fang G, Rozowsky J et al (2010) Annotating non-coding regions of the genome. *Nat Rev Genet* 11:559–571
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291 (5507):1304–1351
3. Holliday R (2006) Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 1:76–80
4. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL (2007) Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13056–13061
5. Hewagama A, Richardson B (2009) The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 33:3–11
6. Fassbender HG, Simmling-Annefeld M (1983) The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis. *J Pathol* 139:399–406
7. Takami N, Osawa K, Miura Y et al (2006) Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum* 54:779–787
8. Nile CJ, Read RC, Akil M et al (2008) Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58:2686–2693
9. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA et al (2009) DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 60:3613–3622
10. Fabbri M, Calin GA (2010) Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Adv Genet* 70:87–99
11. Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E et al (2010) Altered expression of miR-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum* [Epub ahead of print Oct 27]
12. Mani S, Herceg Z (2010) DNA demethylating agents and epigenetic therapy of cancer. *Adv Genet* 70:327–340
13. Barnes PJ (2009) Targeting the epigenome in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 6:693–696
14. Villagra A, Cheng F, Wang HW et al (2009) The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol* 10:92–100
15. Bertrand P (2010) Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem* 45:2095–2116
16. Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ (2009) Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Lett* 280:211–221
17. Willyard C (2010) The saving switch. *Nat Med* 16:18–21
18. Chung YL, Lee MY, Wang AJ et al (2003) A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol Ther* 8:707–717
19. Huber LC, Brock M, Hemmatzad H et al (2007) Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56:1087–1093
20. Chen J, Xu X (2010) Diet, epigenetic, and cancer prevention. *Adv Genet* 71:237–255
21. Hong S, Derfoul A, Pereira-Mouries L et al (2009) A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *Faseb J* 23:3539–3552
22. Higashiyama R, Miyaki S, Yamashita S et al (2010) Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 20:11–17
23. Huber LC, Distler JH, Moritz F et al (2007) Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 56:2755–2764
24. Niederer F, Brentano F, Ospelt C et al (2009) Expression of sirtuins in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 60:552
25. Dvir-Ginzberg M, Gagarina V, Lee EJ et al (2008) Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by SirT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem* 283:36300–36310
26. Litt M, Qiu Y, Huang S (2009) Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep* 29:131–141
27. Crea F, Hurt EM, Farrar WL (2010) Clinical significance of polycomb gene expression in brain tumors. *Mol Cancer* 9:265
28. Ciavatta DJ, Yang J, Preston GA et al (2010) Epigenetic basis for aberrant upregulation of autoantigen genes in humans with ANCA vasculitis. *J Clin Invest* 120:3209–3219
29. Trenkmann M, Brock M, Gay R et al (2008) The polycomb group protein EZH2 is up regulated in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and induced by TNF. *Arthritis Rheum* 58:S189
30. Shan Y, Zheng J, Lambrecht RW et al (2007) Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes. *Gastroenterology* 133:1166–1174